

PACT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 03 January 2001 (03.01.01)	
International application No. PCT/DE00/01404	Applicant's or agent's file reference RKO - 15 626 WO
International filing date (day/month/year) 03 May 2000 (03.05.00)	Priority date (day/month/year) 20 May 1999 (20.05.99)
Applicant NAUMANN, Dieter et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

01 November 2000 (01.11.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 04 mai 2001 (04.05.01)	Référence du dossier du déposant ou du mandataire PCT 134
Demande internationale no PCT/FR00/01712	Date de priorité (jour/mois/année) 22 juin 1999 (22.06.99)
Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 juin 1999 (22.06.99)
Déposant MARTIN, Gérard etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

19 janvier 2001 (19.01.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Antonia Muller no de téléphone: (41-22) 338.83.38
---	---

Translation

10/019 000
PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT 134	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01712	International filing date (day/month/year) 21 June 2000 (21.06.00)	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC H01J 49/42		
Applicant EUROFINS SCIENTIFIC		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>6</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 19 January 2001 (19.01.01)	Date of completion of this report 19 September 2001 (19.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01712

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-11, 16, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages 12-15, filed with the letter of 25 July 2001 (25.07.2001),
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-3, filed with the letter of 25 July 2001 (25.07.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The amendments submitted with the letter of 25 July 2001 extend the subject matter of the application beyond the scope of the application as filed. They therefore contravene the provisions of PCT Article 34(2)(b). This applies to the following amendments:

page 13, line 17 (-5); page 15, line 10 (-100 and -160), line 11 (-28), line 12 (-31 and -5), line 14 (-200 and -400).

It is not immediately apparent that no possibility other than replacement of the shaded square by "-" was envisaged by the applicant (the symbol "+" would be another possibility).

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-3	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-3	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are referred to:

D1 = FR-A-2 673 291

D2 = GB-A-2 120 007.

N: D1 discloses a method for verifying the origin of a product consisting of a mixture of organic compounds comprising the following steps:

- separation of the mixture (by chromatography) into its organic compounds;
- conversion of the organic compounds into CO₂ (by combustion);
- analysis using an isotopic mass spectrometer to measure the C₁₃ enrichment of each compound of the mixture;
- selection of a compound for labelling; and
- modification of the C₁₃ enrichment of the compound by isotopic labelling.

The method of Claim 1 is distinguished from that of D1 by the first step, in which a mixture is separated (D1 does not concern a complex molecule), and by the absence

of isotopic labelling of the complex molecule to be analysed (PCT Article 33(2)).

IS: The problem addressed by the present invention can be considered to be that of providing a method for analysis of complex molecules based on natural isotopic abundance, that is to say providing a method for analysis of a complex molecule requiring no prior isotopic labelling.

The present application is based on the finding that it is possible to obtain an isotopic distribution map for a complex molecule by means of selective isotopic labelling, which therefore results from the number of steps required to produce the complex molecule.

D2 discloses a method of analysis in which a molecule is fragmented using an electron beam in a mass spectrometer to obtain analysable ions. In this method, the fragmentation step does not yield stable molecular entities. Consequently, this document cannot be used to solve the problem stated above, and Claim 1 is considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

Claims 2 and 3 are dependent on Claim 1 and therefore likewise satisfy the PCT requirements of novelty and inventive step.

IA: The invention is also industrially applicable (PCT Article 33(4)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01712

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. The description must be made consistent with the new Claim 1 (see page 4, last paragraph).

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PCT 134	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 01712	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/07/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 22/06/1999
Déposant EUROFINS SCIENTIFIC		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 2 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.



la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :



contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.



déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.



La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégi**,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant



le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégi est la Figure n°



suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 21 SEP 2001

WIPO PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



3 T

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PCT 134	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01712	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 22/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB H01J49/42		
Déposant EUROFINS SCIENTIFIC et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 6 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 19/01/2001	Date d'achèvement du présent rapport 19.09.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Komenda, P N° de téléphone +49 89 2399 2777 

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01712

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-11,16 version initiale

12-15 reçue(s) le 27/07/2001 avec la lettre du 25/07/2001

Revendications, N°:

1-3 reçue(s) le 27/07/2001 avec la lettre du 25/07/2001

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
 - ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
 - ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).
3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
 - ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
 - ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
 - ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

☐ de la description, pages :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01712

- ☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☒ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)
voir feuille séparée*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-3 Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-3 Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-3 Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

Point I 5:

Les modifications introduites avec la lettre du 25.07.2001 conduisent à étendre l'objet de la demande au-delà du contenu de la demande telle qu'elle a été déposée. Elles vont par conséquent à l'encontre des dispositions de l'article 34(2) b) PCT. Les modifications concernées sont les suivantes:

page 13, ligne 17 (-5); page 15, ligne 10 (-100 et -160), ligne 11 (-28), ligne 12 (-31 et -5), ligne 14 (-200 et -400).

Il n'apparaît pas immédiatement qu'aucune possibilité autre que la substitution du carré grisé par le signe "-" ait été envisagé par le demandeur (le signe "+" serait une autre possibilité).

Point V:

Il est fait référence aux documents suivants:

D1 = FR-A-2 673 291

D2 = GB-A-2 120 007

N: Le document D1 divulgue un procédé d'authentification de l'origine d'un produit constitué d'un mélange de composés organiques comprenant les étapes suivantes:

- séparer le mélange (par chromatographie) en ses composés organiques,
- transformation en CO_2 (par combustion) des composés organiques
- analyse à l'aide d'un spectromètre de masse isotopique en vue de mesurer l'enrichissement en C_{13} de chaque composé du mélange
- choisir un composé à marquer et
- modifier l'enrichissement en C_{13} de ce composé par marquage isotopique.

Le procédé de la revendication 1 se différencie de celui décrit dans D1 par la première étape consistant à séparer un mélange (dans D1 il ne s'agit pas d'une

molécule complexe), et par l'absence d'un marquage isotopique de la molécule complexe à analyser (Article 33(2) PCT).

AI: Le problème que se propose de résoudre la présente invention peut être considéré comme étant la disposition d'un procédé d'analyse de molécules complexes basé sur l'abondance isotopique naturelle, c'est-à-dire la disposition d'un procédé d'analyse d'une molécule complexe, qui ne nécessite pas préalablement un marquage isotopique.

La présente demande est basée sur la constatation qu'il est possible d'établir une carte de distribution isotopique d'une molécule complexe à partir d'un marquage isotopique sélectif, qui résulte en conséquence du nombre d'étapes pour produire la molécule complexe.

Le document D2 divulgue un procédé d'analyse consistant à fragmenter une molécule par l'intermédiaire d'un faisceau d'électrons dans un spectromètre de masse pour obtenir des ions analysables. Dans ce procédé, l'étape de fragmentation ne permet pas d'obtenir des entités moléculaires stables. Par conséquent, ce document ne peut pas être utilisé pour résoudre le problème énoncé ci-dessus et il est considéré que la revendication 1 implique une activité inventive (Article 33(3) PCT).

Les revendications 2 et 3 dépendent de la revendication 1 et satisfont donc également, en tant que telles, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.

AI: L'application industrielle est aussi reconnue (Article 33(4) PCT).

Point VII:

1. La description doit être harmonisée avec la nouvelle revendication 1 (voir page 4, dernière paragraphe).

12

Occurrence et méthodes de synthèse envisageables pour les matières premières P_{-1b}, P_{-2b}, P_{-4a1}, P_{-4a2} et P_{-4b}:

P_{-1b} : N-méthylpipérazine C₅H₁₂N₂ M= 100,16 CAS 109-01-3

5

P_{-2b} : acide chloro-sulfonique SO₃HCl M= 116,52 CAS 7790-94-5

P_{-4a1} et P_{-4a2} : 1H-pyrazole, 1-méthyl, 3-n propyl, 4-amino, 5-cyano ou acétamido
C₈H₁₂N₄ ou C₈H₁₄N₄O

10

La synthèse du cycle 1H-pyrazole substitué peut se faire par l'intermédiaire d'une réaction de cyclisation en hydrazone à partir d'acylacétate d'éthyle et addition
15 nucléophile de l'ion CN^o sur le carbonyle de l'hydrazone cyclique.

P_{-4b} : acide-2-éthoxy benzoïque C₉H₁₀O₃ M= 166.18 CAS 134-11-2

20

Les matières premières P-1b, P-2b et P-4b peuvent se trouver dans le commerce mais il est intéressant de préparer P-4a1 et P-4a2 au moyen des synthèses conventionnelles des cycles 1H- pyrazole. Ces synthèses
25 font généralement appel à des hydrazines substituées du type R₁-NH-NH₂ et des composés α-dicarboxylés R₃-CO-CH₂-CO-R₄.

Les teneurs isotopiques des matières premières utilisables
30 sont bien documentées dans la littérature.

Les rapports isotopiques R(i) sont exprimés en déviations δ(i) ‰ par rapport à une référence internationale R(ref) au moyen de la relation :

35
$$\delta(i) = ((R(i)/R(ref)) - 1) * 1000 \text{ ‰}$$

²H et ¹⁸O : V.SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)

13

^{13}C : V.PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite)

^{15}N : azote atmosphérique

^{34}S : CDT, échantillon de Troilite extrait du Canyon Diablo (USA)

5

Les cycles benzéniques d'origine fossile (pétrole) sont caractérisés par des valeurs $\delta^2\text{H}$ comprises entre -20 et -120 ‰ et les chaînes latérales saturées entre 0 et -70 ‰. Les mesures sont réalisées par RMN (SNIF-NMR) pour les chaînes latérales et la teneur globale par Spectrométrie de Masse (SMRI). Les teneurs globales en ^{13}C mesurées par SMRI sont généralement égales à -28.5 ‰ avec un écart type de l'ordre de 2 ‰ et les teneurs isotopiques en ^{13}C des chaînes latérales alkylées ou fonctionnelles sont mesurées par RMN. Selon le procédé de synthèse et l'origine de la matière première des chaînes latérales, les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ peuvent varier entre -5 et -100 ‰ et offrent ainsi un potentiel de caractérisation important.

Les molécules azotées d'origine synthétique ont des valeurs ^{13}C et ^{15}N , mesurées par SMRI, relativement faibles et égales respectivement à -30 ‰ (1.5) et -20 ‰ (10) mais, dans ce dernier cas, les réactions de cyclisation en pyrazoles et xanthines induisent des appauvrissements sensibles en isotopes lourds. A ce niveau, on peut considérer que les valeurs $\delta^{15}\text{N}$ du groupe CN ou du groupe CONH_2 reflètent celles des matières premières car l'introduction dans le motif 1H-pyrazole se fait sans fractionnement isotopique significatif. La teneur en ^{15}N du groupe NH_2 est d'autant plus faible par rapport à celle de la matière première que le rendement de la réaction est faible.

Les acides chlorosulfoniques commerciaux sont généralement issus de l'acide sulfurique dont la teneur en ^{34}S peut varier entre -25 et +25 ‰ selon l'origine de la matière

14

premières (S natif, pyrites) et du procédé de fabrication. Cependant, une fois synthétisé, le groupe $-SO_2-$ est un excellent traceur naturel et la teneur en ^{34}S est déterminée par SMRI.

5

Enfin, il est intéressant de noter que la cartographie isotopique de l'acide citrique est très bien définie et que l'origine du citrate de sildenafil peut être précisée par la considération de la distribution isotopique dans le
10 fragment citrate. Ainsi, la teneur en 2H mesurée par RMN varie entre -40 à -80 ‰ pour des acides citriques biotechnologiques mais les valeurs $\delta^{13}C$ sont égales respectivement à -11 ‰ (1) ou -25 ‰ (1) selon que la matière première est constituée par un sucre C34 ou C3. Les
15 acides citriques naturels extraits de fruits tels que les citrus, ananas ou fruits rouges ont des valeurs δ^2H très voisines de 0 ‰ (25).

Les gammes de variations que nous venons de situer prouvent
20 la faisabilité de la démarche de protection d'un médicament ou produit actif. Une large possibilité de choix de valeurs isotopiques d'un (ou plusieurs) fragment(s) est offerte à la firme productrice souhaitant réaliser un « marquage naturel » de son produit.

25

d) Caractérisation des différentes étapes réactionnelles par l'établissement d'un profil de fractionnement isotopique :

▪ Etape : niveau -4 ---> niveau -3

30 Aucune modification des teneurs 2H et ^{13}C du cycle benzénique n'est attendue et, de la même façon, la valeur $\delta^{18}O$ du groupe éthoxy ne doit pas varier. La variation la plus significative se situe au niveau de la fonction NH_2 de P(-4a) qui subit un fractionnement
35 isotopique $^{15}N/^{14}N$ proportionnel à l'effet cinétique α de la réaction de formation de la liaison amide et le

15

fractionnement correspondant est mesuré par SMRI.

Il est à noter toutefois que la matière première P(-4b),
acide éthoxy-2 benzoïque, peut être marquée
naturellement et spécifiquement sans ajout de molécules
enrichies de la façon suivante :

Le groupe O-C₂H₅ est marqué naturellement en ²H, ¹³C ou ¹⁸O
à partir de molécules d'éthanol convenablement choisies.
Un éthanol de synthèse présente des teneurs en ²H égales
respectivement à -100 et -160 ‰ sur les deux sites CH₃
et CH₂ avec des teneurs ¹³C de l'ordre de -28 à -31 ‰ et
des teneurs ¹⁸O égales à -5-10 ‰. Par ailleurs, un
éthanol naturel pourra présenter des teneurs en ²H, ¹³C,
ou ¹⁸O respectivement égales à -200 et -400 ‰ (²H), -11
‰ (¹³C) et +7/+10 (‰). Ces deux types de groupe éthoxy
disponibles commercialement sans ajouts enrichis sont
facilement introduits dans la molécule d'acide o-
hydroxybenzoïque au moyen de réactions conventionnelles
pour former la matière première P(-4b). Les
caractéristiques isotopiques de cette matière première,
qui devient un fragment typique tel que décrit ci-
dessus, se retrouvent dans la molécule finale de citrat
de sildenafil.

▪ Etape : niveau -3 ---> niveau -2

Au cours de cette étape, on peut observer par SMRI des
variations caractéristiques des teneurs

δ ¹⁵N des atomes d'azote du cycle pyrimidinone .

Les valeurs δ ²H et δ ¹⁸O des sites NH et C=O ne sont pas
exploitables car elles dépendent des échanges chimiques
avec le milieu.

▪ Etape : niveau -2 ---> niveau -1

Au cours d cette étape réactionnelle, le cycle
benzénique est sulfoné au moyen d'une réaction du type
substitution électrophile à basse température .La teneur

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'analyse d'un échantillon d'une molécule complexe par rapport à un lot de la même molécule complexe
5 de référence en vue de la détermination de leur degré de similitude et/ou de la caractérisation de leur procédé de fabrication,
caractérisé en ce qu'on scinde la molécule complexe en au moins deux sous-entités moléculaires, cette scission étant
10 répétable sur les sous-entités moléculaires jusqu'à obtention de sous-entités moléculaires analysables et isolables, en ce qu'on détermine, en fonction des sites atomiques des produits de scission concernés par les réactions généralement chimiques de scission, le ou les
15 isotopes à étudier, en ce qu'on établit, pour au moins une partie des produits de scission, leur profil isotopique et en ce qu'on compare le profil isotopique des produits de scission au profil isotopique de matière(s) première(s) déjà répertoriée(s) et intervenant dans le procédé de
20 synthèse de la molécule complexe de référence et/ou au profil isotopique de produits de scission de la molécule complexe de référence soumise aux mêmes réactions de scission.
- 25 2. Procédé selon la revendication 1,
caractérisé en ce que, à partir du ou des isotopes sélectionnés, on établit le profil isotopique d'au moins une partie des produits de scission au moins par résonance magnétique nucléaire RMN pour la mesure de la teneur
30 isotopique spécifique positionnelle et éventuellement par spectrométrie de masse des rapports isotopiques pour la mesure de la teneur isotopique globale.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2.

35

17bis

caractérisé en ce que, lors de la fabrication d la
molécul complexe de référence devant être soumise aux
mêmes réactions de scission que la molécule complexe à
analyser, on sélectionne au moins une matière première
5 et/ou un produit intermédiaire et/ou des conditions d
synthèse de manière à conférer à au moins l'un des produits
de scission de la molécule complexe de référence un
caractère unique détectable lors de l'analyse sans
enrichissement par marquage isotopique et/ou adjonction
10 d'éléments exogènes.

5

10

15 Procédé d'analyse d'un échantillon d'une molécule complexe
par rapport à un lot de la même molécule complexe de
référence

La présente invention concerne un procédé d'analyse d'un
20 échantillon d'une molécule complexe par rapport à un lot de
la même molécule complexe de référence, en vue notamment de
la détermination de leur degré de similitude et/ou de la
caractérisation de leur procédé de fabrication.

25 La contrefaçon de produits complexes est devenue un
véritable fléau, en particulier dans les industries de la
chimie fine, de la cosmétique et de la pharmacie. La
détection des contrefaçons de produits complexes par
analyse physico-chimique est souvent fondée sur l'analyse
30 des traces de produits secondaires de la synthèse, de
catalyseurs ou d'impuretés. Par exemple, il a été constaté
par analyse chromatographique en phase liquide (Asakawa,
Shuichi; Kato, Koichi; Inoma, Susumu Hakodate Customs
Laboratory, Hakodate-shi, 040, Japan, Kanzei Chuo
35 Bunsekishoho (1997), 36, 37-43) que certains herbicides à
base de glyphosate, fabriqués aux Etats-Unis et importés au
Japon, transgressaient des brevets japonais. En utilisant
aussi une technique de chromatographie en phase gazeuse

couplée à la spectrométrie de masse, E.Charton, M.Wierer, J.M. Spieser, A. Van Dorsselaer, et G.Rautmann (European Department for the Quality of Medicines, Council of Europe, Strasbourg, F-67029, Pharm. Pharmacol. Commun. (1999), 5(1), 61-66) ont pu mettre en évidence une contrefaçon d'un médicament, la somatropine, décrit dans la pharmacopée Européenne, qui était en fait un produit dérivé de la somatropine d'origine humaine. Des méthodes chimiques conventionnelles ont permis de prouver que des comprimés d'une substance narcotique, la fenethylline, avaient été préparés par détournement d'un brevet allemand (N. Al-Gharably et A.R. Al-Obaid, College of Pharmacy, King Saud University, Riyadh, 11451, Saudi Arabia, J. Forensic Sci. Soc. (1994), 34(3), 165-7). De même des contrefaçons d'antibiotiques de la série des β - lactames ont été étudiées par électrophorèse capillaire, au "National Forensic Chemistry Center" de la "US Food and Drug Administration", 1141 Central Parkway, Cincinnati, OH, 45202, USA et décrites dans le Journal of Chromatography., A (1994), 674(1-2), 153-63.

Ces méthodes compositionnelles ne sont pas toujours efficaces et elles peuvent révéler des faux-positifs. De plus, elles ne peuvent pas être mises en oeuvre dans tous les cas en raison de l'absence de traceurs caractéristiques.

Un autre procédé d'authentification de l'origine d'un produit constitué d'un mélange de composés organiques est décrit dans le brevet FR-A-2.673.291. Ce procédé comporte une étape d'analyse séparative du produit par chromatographie en phase gazeuse, une étape de transformation en CO_2 par combustion des composés du produit suivie d'une étape d'analyse par spectromètre de masse isotopique en vue de mesurer l'enrichissement en C_{13} de chaque composé du mélange avant de choisir un composé à marquer, notamment en modifiant l'enrichissement en C_{13} de ce composé ou en additionnant des molécules similaires et

dont la richesse en C_{13} a été préalablement augmentée ou diminuée. L'enrichissement par marquage isotopique nécessaire à l'authentification de l'origine d'un produit est un inconvénient majeur de ce procédé. En effet, cette
5 étape oblige l'industriel à modifier son process industriel pour pouvoir marquer et authentifier ses produits. Cette obligation est liée à la suite d'étapes mises en oeuvre dans le cadre du procédé d'analyse, ces étapes ne permettant pas d'obtenir des informations suffisamment
10 détaillées sur l'origine des produits pour s'exempter d'une étape de marquage du produit par enrichissement.

On connaît également, comme cela est décrit dans le brevet GB-B-2.120.007, un procédé d'analyse consistant à
15 fragmenter une molécule par l'intermédiaire d'un faisceau d'électron dans une chambre d'un spectromètre de masse à double focalisation pour obtenir des ions métastables analysables au moyen dudit spectromètre de masse. Toutefois, dans ce procédé, l'étape de fragmentation ne
20 permet pas d'obtenir des sous entités moléculaires, produits parfaitement stables et isolables, mais des ions métastables de durée de vie de l'ordre de quelques fractions de secondes. Par ailleurs, la nature des fragments ainsi que le site moléculaire où s'exerce la
25 coupure par le faisceau d'électron du spectromètre de masse sont conditionnés par la présence de l'isotope à déterminer. Ces deux caractéristiques de ce procédé le distinguent fondamentalement d'un procédé dans lequel on utilise un spectromètre de masse des rapports isotopiques.

30

Parallèlement, des techniques d'analyse plus puissantes ont été développées. Tel est le cas de la technique de spectrométrie de masse de rapports isotopiques (SMRI). Ainsi, il est possible de caractériser le fractionnement
35 isotopique naturel spécifique par Résonance Magnétique Nucléaire (méthode RMN-FINS) en mesurant les teneurs isotopiques sur plusieurs sites moléculaires (voire tous les sites) d'une molécule. Toutefois, cette technique n'est

à ce jour utilisée que pour des molécules simples pouvant être directement analysées.

Un but de la présente invention est de proposer un procédé d'analyse de molécules complexes basé sur une méthodologie originale de mise en oeuvre des techniques isotopiques en abondance naturelle.

Un autre but de la présente invention est de proposer un procédé d'analyse de molécules complexes permettant de différencier un lot de molécules complexes par rapport à un autre lot et d'établir à posteriori l'historique du procédé de fabrication d'une telle molécule complexe sans avoir modifié au préalable le procédé de fabrication d'une telle molécule complexe.

A cet effet, l'invention a pour objet un procédé d'analyse d'un échantillon d'une molécule complexe par rapport à un lot de la même molécule complexe de référence en vue notamment de la détermination de leur degré de similitude et/ou de la caractérisation de leur procédé de fabrication, caractérisé en ce qu'on scinde la molécule complexe en au moins deux sous-entités moléculaires, en ce que, si nécessaire, on scinde au moins l'un des produits de scission en au moins deux nouvelles sous entités moléculaires et en ce qu'on répète cette opération de scission sur au moins une partie des produits de scission jusqu'à obtention de sous entités moléculaires analysables et isolables, en ce qu'on détermine, en fonction des sites atomiques des produits de scission concernés par les réactions généralement chimiques de scission, le ou les isotopes à étudier, en ce qu'on établit, pour au moins une partie des produits de scission, leur profil isotopique et en ce qu'on compare le profil isotopique des produits de scission au profil isotopique de matière(s) première(s) déjà répertoriée(s) et intervenant dans le procédé de synthèse de la molécule complexe de référence et/ou au profil isotopique de produits de scission de la molécule

complexe de référence soumise aux mêmes réactions de scission.

La mise en oeuvre des étapes précitées permet d'appliquer un tel procédé à n'importe quelle molécule complexe sans avoir procédé à un marquage notamment par enrichissement en isotope de la molécule complexe à analyser.

Selon un mode de mise en oeuvre particulier de l'invention, à partir du ou des isotopes sélectionnés, on établit le profil isotopique d'au moins une partie des produits de scission au moins par résonance magnétique nucléaire (RMN) pour la mesure de la teneur isotopique spécifique positionnelle et éventuellement par spectrométrie de masse des rapports isotopiques (SMRI) pour la mesure de la teneur isotopique globale. Il est à noter que dans les deux paragraphes qui précèdent et dans ce qui suit, on entend par profil isotopique la détermination de l'abondance isotopique sur un ou plusieurs sites d'une molécule et non pas la mesure du rapport isotopique globale sur l'ensemble de la molécule, rapport mesuré par spectrométrie de masse isotopique.

L'invention repose sur la constatation suivante de ses inventeurs. La pluparts des molécules organiques sont obtenues au moyen d'une séquence réactionnelle comportant un nombre d'étapes qui peut souvent être important quand la complexité de la molécule s'accroît. Chacune de ces étapes est caractérisée par des effets isotopiques cinétiques (et/ou thermodynamiques) qui provoquent un fractionnement isotopique spécifique, c'est-à-dire un marquage isotopique sélectif, sur les sites atomiques (H, C, N, O...) directement impliqués dans la réaction ou situés au voisinage immédiat des sites réactionnels. Il est ainsi possible d'établir une carte de distribution isotopique d'une molécule complexe à partir des profils isotopiques des différentes étapes mises en jeu. L'influence des matières premières et des réactifs intermédiaires

susceptibles d'être utilisés est également prise en compte pour l'établissement du profil isotopique de la molécule fondé sur les profils individuels d'un nombre plus ou moins grand de ses fragments constitutifs.

5 La démarche d'authentification s'établit ainsi :
Sur un échantillon de produit authentique P_0 constituant la molécule complexe de référence, on réalise une réaction de coupure sélective de la molécule en au moins deux sous-
10 entités moléculaires P_{-1a} et P_{-1b} plus légères. Les effets isotopiques associés à cette réaction de coupure sont déterminés. Les compositions isotopiques spécifiques de P_{-1a} et P_{-1b} sont ainsi univoquement reliées à celle de P_0 . Les paramètres isotopiques spécifiques des sites
15 moléculaires des fragments sont mesurés par la méthode SNIF-NMR (2H , ^{13}C , ^{15}N). Une mesure des teneurs isotopiques globales par spectrométrie de masse isotopique (SMRI) peut aussi être réalisée (^{13}C , 2H , ^{18}O , ^{15}N , ^{34}S). La sélection des isotopes à analyser est opérée sur la base des données
20 de référence et des caractéristiques spectroscopiques du fragment. Dans de nombreux cas la mesure SNIF-NMR de 2H suffit à la caractérisation.

. si les fragments P_{-1} présentent encore une taille
25 moléculaire incompatible avec une étude directe par SNIF-NMR, on recommence cette séquence d'analyse à partir de $P_{-1(a \text{ ou } b)}$ vers $P_{-2(a \text{ ou } b)}$ et ainsi de suite jusqu'à obtention de molécules généralement utilisées comme matières premières ou intermédiaires de synthèse dans l'industrie
30 organique.

La même étude est ensuite réalisée, strictement dans les mêmes conditions expérimentales, sur la molécule complexe à analyser constituée par exemple d'un produit suspecté
35 d'être une contrefaçon ou le résultat d'une copie illicite de brevet. La comparaison des résultats obtenus dans les deux études permet d'établir une conclusion irréfutable sur la conformité ou la non-conformité du produit et des

procédés mis en oeuvre. Ces deux étapes à la base du procédé suffisent pour répondre à la question : conforme ou non conforme ?.

- 5 Abstraction faite des effets isotopiques de réaction, les paramètres isotopiques des fragments Pi déterminés à partir de la démarche d'authentification ci-dessus sont représentatifs de molécules relativement simples qui sont fréquemment des intermédiaires de la synthèse industrielle
- 10 du médicament ou du produit actif concerné. Ces paramètres constituent donc des indicateurs fiables des éléments de base utilisés par la firme productrice et peuvent faire l'objet d'une exploitation plus poussée. En cas de non conformité, ils permettent, en se référant aux données sur
- 15 les molécules de taille modeste éventuellement déjà répertoriées, de caractériser l'origine des matières premières du produit contrefait. On conclut alors, non seulement que le produit n'est pas conforme mais qu'il a été préparé par tel procédé répertorié ou à partir de telle
- 20 matière première répertoriée. Le procédé d'analyse décrit ci-dessus permet donc éventuellement d'identifier le procédé de fabrication mis en oeuvre par la fabrication d'une molécule complexe non authentique.
- 25 Par ailleurs, le fabricant désireux d'authentifier ultérieurement son médicament ou produit actif, même non protégé par un brevet, peut introduire dans sa chaîne de production un ou plusieurs intermédiaires de synthèse, correspondant à un ou plusieurs fragments Pi possédant un
- 30 profil isotopique qui lui soit propre. Cette méthode crée en fait un marquage du produit sans qu'il soit besoin d'ajouter un élément exogène de marquage (comme ceci est le cas lors d'une utilisation de composés marqueurs particuliers, de métaux traces, ou de produits enrichis en
- 35 isotopes lourds tels que ^{13}C). Une empreinte isotopique spécifique pourra être conférée à l'intermédiaire de synthèse (molécule de taille modeste elle-même synthétisée à partir de dérivés du pétrole ou extraite de matières

végétales, etc.), soit en sélectionnant des matières premières initiales de teneur isotopique particulière et constante, soit en agissant sur les effets isotopiques associés aux réactions de préparation, d'extraction, de purification de l'intermédiaire correspondant à Pi. En présence d'effets isotopiques cinétiques, une variation du rendement par exemple peut suffire à modifier le fractionnement et donc le profil isotopique de l'intermédiaire de synthèse. En appliquant le procédé d'analyse ci-dessus à la molécule complexe ainsi élaborée, on obtiendra un ou des fragments Pi auquel un profil isotopique unique a été conféré. La firme disposera donc de paramètres isotopiques d'un ou plusieurs fragments de son produit qui lui seront propres. Dans cette stratégie, le produit ne souffre pas des réserves qui s'attachent à l'adjonction d'éléments exogènes ou à l'enrichissement par marquage isotopique. Lors du contrôle, le produit suspect est étudié dans les conditions décrites ci-dessus et l'interprétation est faite de la même façon par comparaison des paramètres des fragments du produit suspect et du produit de référence. Dans ce cas, le contrôle peut être simplifié puisqu'il suffit de caractériser le ou les fragments typiques. Dans cette démarche, le fabricant dispose d'une méthode pratiquement incontournable de caractérisation de son produit et même de caractérisation de ses lots puisqu'il lui suffit de changer la source d'une matière première ou les conditions de la synthèse d'un fragment pour conférer à Pi un profil typique.

En résumé, dans le cadre du procédé d'analyse décrit ci-dessus, il est possible, lors de la fabrication de la molécule complexe de référence devant être soumise aux mêmes réactions de scission que la molécule complexe à analyser, de sélectionner au moins une matière première et/ou un produit intermédiaire et/ou des conditions de synthèse de manière à conférer à au moins l'un des produits de scission de la molécule complexe de référence, appelé Pi, ci-dessus un caractère unique détectable lors de

l'analyse sans enrichissement par marquage isotopique et/ou adjonction d'éléments exogènes.

Il est à noter que les fragments ou sous-unités moléculaires sont obtenus par des voies de dégradation chimique appropriées telles qu'elles sont décrites dans l'exemple d'application. Les fragments sont ensuite séparés et purifiés par différentes techniques, comme par exemple la chromatographie en phase liquide, en phase gazeuse ou sur gel de silice, la distillation, la recristallisation, etc. Les protocoles d'extraction et de purification sont préalablement soigneusement étalonnés pour éviter tout fractionnement isotopique incontrôlé.

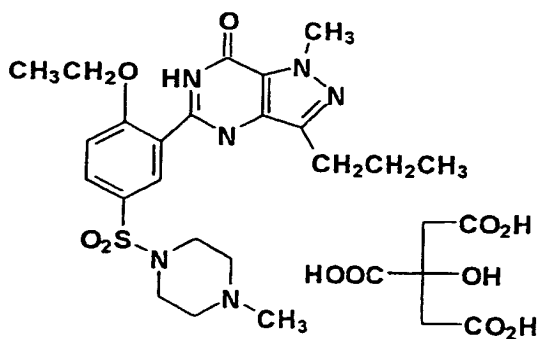
Un exemple d'analyse du procédé de fabrication d'une molécule complexe est décrit ci-dessous.

a) Description de la molécule à analyser :

A titre d'illustration du procédé, considérons le cas du citrate de sildenafil [VIAGRA (marque déposée)] fabriqué par Pfizer) appartenant à la catégorie des agents antianginaux du type pyrazolopyrimidinone.

Le citrate de sildenafil possède la structure chimique suivante :

$C_{22} H_{30} N_6 O_4 S$, citrate $M = 474,6$

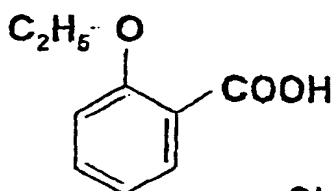


30

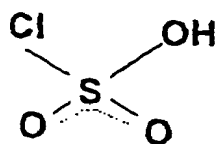
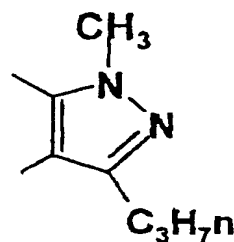
1-[4-éthoxy-3-(6,7-dihydro-1-méthyl-7-oxo-3-propyl-1 H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)phénylsulphonyl]-4-méthylpiperazine citrate

Cette molécule peut être découpée en plusieurs fragments moléculaires portant un message isotopique caractéristique, dénommés « synthons isotopiques »

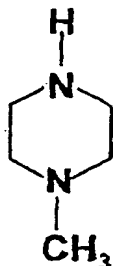
Dérivé salicylique



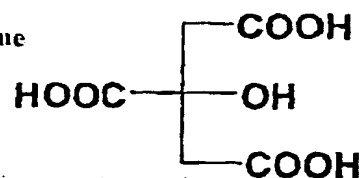
1H-pyrazole substitué



Acide chlorosulfonique

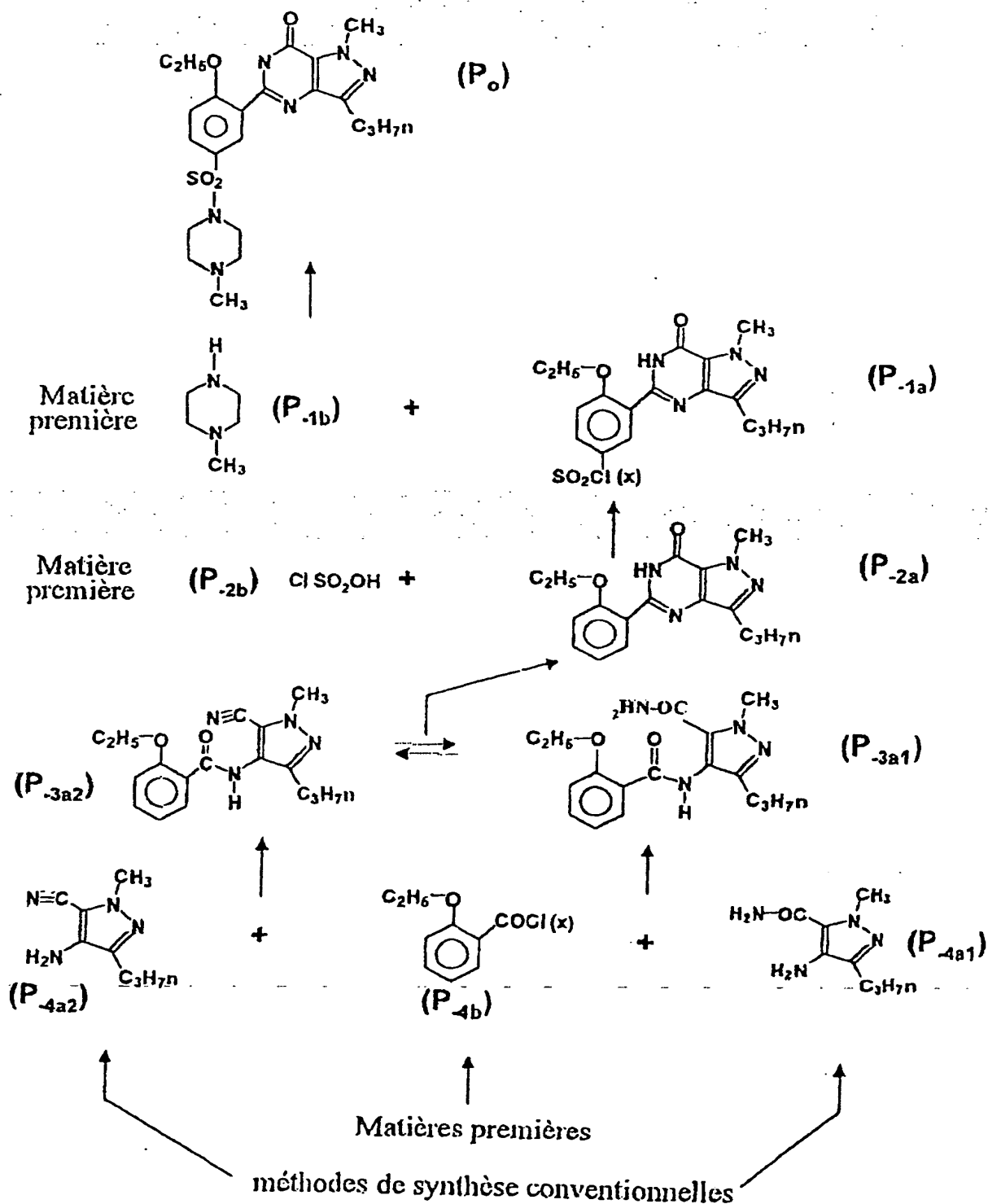


méthylpipérazine



acide citrique

Les réactions de rétro filiation isotopique utilisables s'établissent ainsi :



Occurrence et méthodes de synthèse envisageables pour les matières premières P_{-1b}, P_{-2b}, P_{-4a1}, P_{-4a2} et P_{-4b}:

P_{-1b} : N-méthylpipérazine C₅H₁₂N₂ M= 100,16 CAS 109-01-3

P_{-2b} : acide chloro-sulfonique SO₃HCl M= 116,52 CAS 7790-94-5

P_{-4a1} et P_{-4a2} : 1H-pyrazole, 1-méthyl, 3-n propyl, 4-amino, 5-cyano ou acétamido
C₈H₁₂N₄ ou C₈H₁₄N₄O

La synthèse du cycle 1H-pyrazole substitué peut se faire par l'intermédiaire d'une réaction de cyclisation en hydrazone à partir d'acylacétate d'éthyle et addition nucléophile de l'ion CN⁻ sur le carbonyle de l'hydrazone cyclique.

P_{-4b} : acide-2-éthoxy benzoïque C₉H₁₀O₃ M= 166.18 CAS 134-11-2

Les matières premières P-1b, P-2b et P-4b peuvent se trouver dans le commerce mais il est intéressant de préparer P-4a1 et P-4a2 au moyen des synthèses conventionnelles des cycles 1H- pyrazole. Ces synthèses font généralement appel à des hydrazines substituées du type R₁-NH-NH₂ et des composés α-dicarboxylés R₃-CO-CH₂-CO-R₄.

Les teneurs isotopiques des matières premières utilisables sont bien documentées dans la littérature.

Les rapports isotopiques R(i) sont exprimés en déviations δ(i) □ par rapport à une référence internationale R(ref) au moyen de la relation :

$$\delta(i) = ((R(i)/R(\text{ref}))-1)*1000 \square$$

²H et ¹⁸O : V.SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)

13

^{13}C : V.PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite)

^{15}N : azote atmosphérique

^{34}S : CDT, échantillon de Troilite extrait du Canyon Diablo (USA)

5

Les cycles benzéniques d'origine fossile (pétrole) sont caractérisés par des valeurs $\delta^2\text{H}$ comprises entre -20 et -120 ‰ et les chaînes latérales saturées entre 0 et -70 ‰

Les mesures sont réalisées par RMN (SNIF-NMR) pour les chaînes latérales et la teneur globale par Spectrométrie de Masse (SMRI). Les teneurs globales en ^{13}C mesurées par SMRI sont généralement égales à -28.5 ‰ avec un écart type de l'ordre de 2 ‰ et les teneurs isotopiques en ^{13}C des chaînes latérales alkylées ou fonctionnelles sont mesurées par RMN. Selon le procédé de synthèse et l'origine de la matière première des chaînes latérales, les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ peuvent varier entre -5 ‰ et -100 ‰ et offrent ainsi un potentiel de caractérisation important.

20 Les molécules azotées d'origine synthétique ont des valeurs ^{13}C et ^{15}N , mesurées par SMRI, relativement faibles et égales respectivement à -30 ‰ (1.5) et -20 ‰ (10) mais, dans ce dernier cas, les réactions de cyclisation en pyrazoles et xanthines induisent des appauvrissements
25 sensibles en isotopes lourds. A ce niveau, on peut considérer que les valeurs $\delta^{15}\text{N}$ du groupe CN ou du groupe CONH_2 reflètent celles des matières premières car l'introduction dans le motif 1H-pyrazole se fait sans fractionnement isotopique significatif. La teneur en ^{15}N du
30 groupe NH_2 est d'autant plus faible par rapport à celle de la matière première que le rendement de la réaction est faible.

Les acides chlorosulfoniques commerciaux sont généralement
35 issus de l'acide sulfurique dont la teneur en ^{34}S peut varier entre -25 et +25 ‰ selon l'origine de la matière

14

premières (S natif, pyrites) et du procédé de fabrication. Cependant, une fois synthétisé, le groupe $-SO_2-$ est un excellent traceur naturel et la teneur en ^{34}S est déterminée par SMRI.

5

Enfin, il est intéressant de noter que la cartographie isotopique de l'acide citrique est très bien définie et que l'origine du citrate de sildenafil peut être précisée par la considération de la distribution isotopique dans le
10 fragment citrate. Ainsi, la teneur en 2H mesurée par RMN varie entre -40 à -80 ‰ pour des acides citriques biotechnologiques mais les valeurs $\delta^{13}C$ sont égales respectivement à -11 ‰ (1) ou -25 ‰ (1) selon que la
15 matière première est constituée par un sucre C34 ou C3. Les acides citriques naturels extraits de fruits tels que les citrus, ananas ou fruits rouges ont des valeurs δ^2H très voisines de 0 ‰ (25).

Les gammes de variations que nous venons de situer prouvent
20 la faisabilité de la démarche de protection d'un médicament ou produit actif. Une large possibilité de choix de valeurs isotopiques d'un (ou plusieurs) fragment(s) est offerte à la firme productrice souhaitant réaliser un « marquage naturel » de son produit.

25

d) Caractérisation des différentes étapes réactionnelles par l'établissement d'un profil de fractionnement isotopique :

▪ Etape : niveau -4 ---> niveau 3

30 Aucune modification des teneurs 2H et ^{13}C du cycle benzénique n'est attendue et, de la même façon, la valeur $\delta^{18}O$ du groupe éthoxy ne doit pas varier. La variation la plus significative se situe au niveau de la fonction NH_2 de P(-4a) qui subit un fractionnement
35 isotopique $^{15}N/^{14}N$ proportionnel à l'effet cinétique α de la réaction de formation de la liaison amide et le

fractionnement correspondant est mesuré par SMRI.

Il est à noter toutefois que la matière première P(-4b),
acide éthoxy-2 benzoïque, peut être marquée
naturellement et spécifiquement sans ajout de molécules
enrichies de la façon suivante :

Le groupe $O-C_2H_5$ est marqué naturellement en 2H , ^{13}C ou ^{18}O à partir de molécules d'éthanol convenablement choisies. Un éthanol de synthèse présente des teneurs en 2H égales respectivement à ≈ 100 et ≈ 160 ‰ sur les deux sites CH_3 et CH_2 avec des teneurs ^{13}C de l'ordre de ≈ 28 à ≈ 31 ‰ et des teneurs ^{18}O égales à $\approx 5-10$ ‰. Par ailleurs, un éthanol naturel pourra présenter des teneurs en 2H , ^{13}C , ou ^{18}O respectivement égales à ≈ 200 et ≈ 400 ‰ (2H), -11 ‰ (^{13}C) et $+7/+10$ (^{18}O). Ces deux types de groupe éthoxy disponibles commercialement sans ajouts enrichis sont facilement introduits dans la molécule d'acide o-hydroxybenzoïque au moyen de réactions conventionnelles pour former la matière première P(-4b). Les caractéristiques isotopiques de cette matière première, qui devient un fragment typique tel que décrit ci-dessus, se retrouvent dans la molécule finale de citrate de sildenafil.

▪ Etape : niveau -3 ---> niveau -2

Au cours de cette étape, on peut observer par SMRI des variations caractéristiques des teneurs

$\delta^{15}N$ des atomes d'azote du cycle pyrimidinone

Les valeurs δ^{2H} et $\delta^{18}O$ des sites NH et $C=O$ ne sont pas exploitables car elles dépendent des échanges chimiques avec le milieu.

▪ Etape : niveau -2 ---> niveau -1

Au cours de cette étape réactionnelle, le cycle benzénique est sulfoné au moyen d'une réaction du type substitution électrophile à basse température. La teneur

16
5 en ^{34}S mesurée par SMRI peut être très légèrement modifiée, mais cette modification est d'autant plus faible que le rendement de la sulfonation est élevé. Aucune modification n'est attendue pour les autres isotopomères de P(-1a).

▪ Etape : niveau -1 ---> niveau 0

10 La fixation du cycle piperazine de (P-1b) sur le groupe sulfonyle de P(-1a) peut provoquer un faible appauvrissement en ^{15}N du fragment pipérazine fixé au citrate de sildanefil. Cet appauvrissement, qui est mesuré par SMRI, peut être éventuellement caractérisé sur le produit de coupure du citrate de sildanefil. Les autres teneurs isotopiques ne sont pas altérées au cours
15 de cette étape.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'analyse d'un échantillon d'une molécule complexe par rapport à un lot de la même molécule complexe de référence en vue notamment de la détermination de leur degré de similitude et/ou de la caractérisation de leur procédé de fabrication, caractérisé en ce qu'on scinde la molécule complexe en au moins deux sous-entités moléculaires, en ce que, si nécessaire, on scinde au moins l'un des produits de scission en au moins deux nouvelles sous-entités moléculaires et en ce qu'on répète cette opération de scission sur au moins une partie des produits de scission jusqu'à obtention de sous-entités moléculaires analysables et isolables, en ce qu'on détermine, en fonction des sites atomiques des produits de scission concernés par les réactions généralement chimiques de scission, le ou les isotopes à étudier, en ce qu'on établit, pour au moins une partie des produits de scission, leur profil isotopique et en ce qu'on compare le profil isotopique des produits de scission au profil isotopique de matière(s) première(s) déjà répertoriée(s) et intervenant dans le procédé de synthèse de la molécule complexe de référence et/ou au profil isotopique de produits de scission de la molécule complexe de référence soumise aux mêmes réactions de scission.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, à partir du ou des isotopes sélectionnés, on établit le profil isotopique d'au moins une partie des produits de scission au moins par résonance magnétique nucléaire RMN pour la mesure de la teneur isotopique spécifique positionnelle et éventuellement par spectrométrie de masse des rapports isotopiques pour la mesure de la teneur isotopique globale.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2,

caractérisé en ce que, lors de la fabrication de la molécule complexe de référence devant être soumise aux mêmes réactions de scission que la molécule complexe à analyser, on sélectionne au moins une matière première et/ou un produit intermédiaire et/ou des conditions de synthèse de manière à conférer à au moins l'un des produits de scission de la molécule complexe de référence un caractère unique détectable lors de l'analyse sans enrichissement par marquage isotopique et/ou adjonction d'éléments exogènes.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01712

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 H01J49/42 B01D59/44 G01N30/72

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 H01J B01D G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FR 2 673 291 A (TEXINFINE SA ; INBIOMED INTERNATIONAL (FR)) 28 août 1992 (1992-08-28)	1
A	page 1 - page 2	2, 3
Y	GB 2 120 007 A (UNIV SHERBROOKE) 23 novembre 1983 (1983-11-23)	1
	page 1 - page 2	
A	EP 0 567 276 A (MDS HEALTH GROUP LTD) 27 octobre 1993 (1993-10-27) abrégé	1-3

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hulne, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Requête internationale No

PCT/FR 00/01712

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
FR 2673291	A	28-08-1992	AUCUN		
GB 2120007	A	23-11-1983	CA	1205211 A	27-05-1986
			US	4529879 A	16-07-1985
EP 0567276	A	27-10-1993	US	5248875 A	28-09-1993
			CA	2090217 A,C	25-10-1993
			DE	69317693 D	07-05-1998
			DE	69317693 T	08-10-1998
			JP	6260135 A	16-09-1994